

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
26 février 2004 (26.02.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 2004/016650 A1

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :  
C07K 14/435, C12N 15/12, 15/63, A61K 38/17,  
A61P 31/00, A01H 5/00, A01N 37/18

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR2003/002517

(22) Date de dépôt international : 12 août 2003 (12.08.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
02/10278 13 août 2002 (13.08.2002) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : EN-  
TOMED [FR/FR]; Rue Tobias Stimmer, F-67400 Illkirch  
(FR).

(72) Inventeur; et

(75) Inventeur/Déposant (pour US seulement) : MEYER,  
Jean-Philippe [FR/FR]; 5, rue Twinger, F-67000 Stras-  
bourg (FR).

(74) Mandataires : BREESÉ, Pierre etc.; 3, avenue de  
l'Opéra, F-75001 Paris (FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,  
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,  
MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD,  
SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,  
US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,  
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet  
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet  
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,  
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,  
TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,  
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des  
revendications, sera republiée si des modifications sont re-  
çues

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.

(54) Title: ANTIMICROBIAL PEPTIDES, POLYPEPTIDES COMPRISING SAME, GENES CODING FOR SAID PEPTIDES,  
VECTORS, TRANSFORMED ORGANISMS AND COMPOSITIONS CONTAINING SAME

(54) Titre : PEPTIDES ANTIMICROBIENS, POLYPEPTIDES COMPRENANT LESDITS PEPTIDES, GENES CODANT LES-  
DITS PEPTIDES, VECTEURS, ORGANISMES TRANSFORMÉS ET COMPOSITIONS LES CONTENANT

(57) Abstract: The invention concerns an isolated peptide characterized in that it corresponds to formula (I): Xaa-Lys-Ile-Pro-Xab-  
Ala-Xac-Lys-Gly-Ala-Xad-Arg-Ala-Leu-Xae-Ala-Ser-Thr-Ala-Xaf-Asp-Ile-Ala-Xag-Phe-Xah-Arg-Lys- Arg-Xai (I), wherein Xaa  
is -NH<sub>2</sub> or the peptide residue Arg or Gly; Xab is the peptide residue Ile-Asn or Val-Glu; Xac is the peptide residue Ile-Lys, Ile-Arg  
or Leu-Lys; Xad is the peptide residue Ser-Arg-Ala-Trp, Lys-Ala-Val-Gly-His-Gly-Leu or Lys-Val-Ala-Gly-Arg-Ala-Trp; Xae is  
the peptide residue Asp-Leu, Asn-Ile or Asp-Leu; Xaf is the peptide residue Tyr or His; Xag is the peptide residue Ser-Ile, Ser-Ala  
or His-Leu; Xah is the peptide residue Asn, Asp or His; Xai is -OH or the peptide residue Glu, Asn or Lys-His, derivatives and  
fragments thereof. The invention also concerns a polypeptide comprising said peptide, a polynucleotide encoding said peptide, a  
chimeric gene, a vector containing said polynucleotide or said chimeric gene and a transformed organism. The invention further  
concerns an antibacterial and/or antifungal composition containing at least one peptide of the invention for use in human and animal  
therapy, in agriculture as well as in the agri-food and phytosanitary industry.

(57) Abrégé : La présente invention a pour objet un peptide isolé caractérisé en ce qu'il répond à la formule (I):  
Xaa-Lys-Ile-Pro-Xab-Ala-Xac-Lys-Gly-Ala-Xad-Arg-Ala-Leu-Xae-Ala-Ser-Thr-Ala-Xaf-Asp-Ile-Ala-Xag-Phe-Xah-Arg-Lys  
Arg-Xai (I) dans laquelle Xaa est -NH<sub>2</sub> ou le reste peptidique Arg ou Gly, Xab est le reste peptidique Ile-Asn ou Val-Glu, Xac  
est le reste peptidique Ile-Lys, Ile-Arg ou Leu-Lys, Xad est le reste peptidique Ser-Arg-Ala-Trp, Lys-Ala-Val-Gly-His-Gly-Leu  
ou Lys-Val-Ala-Gly-Arg-Ala-Trp, Xae est le reste peptidique Asp-Leu, Asn-Ile ou Asp-Leu, Xaf est le reste peptidique Tyr ou  
His, Xag est le reste peptidique Ser-Ile, Ser-Ala ou His-Leu, Xah est le reste peptidique Asn, Asp ou His, Xai est -OH ou le reste  
peptidique Glu, Asn ou Lys-His, ses dérivés et ses fragments. L'invention concerne également un polypeptide comprenant ledit  
peptide, un polynucléotide codant ledit peptide, un gène chimère, un vecteur contenant ledit polynucléotide ou ledit gène chimère  
et un organisme transformé. L'invention concerne également une composition antibactérienne et/ou antifongique contenant au  
moins un peptide de l'invention utilisable en thérapie humaine et animale, en agriculture ainsi que dans l'industrie agro-alimentaire  
et phytosanitaire.

Applicants: Peter David East and Susan  
Elizabeth Brown  
U.S. Serial No.: 10/590,539  
Filed: as §371 national stage of  
PCT/AU2005/000234  
Exhibit 22

WO 2004/016650 A1

PEPTIDES ANTIMICROBIENS, POLYPEPTIDES  
COMPRENANT LESDITS PEPTIDES, GENES CODANT LESDITS PEPTIDES,  
VECTEURS, ORGANISMES TRANSFORMES ET COMPOSITIONS LES  
CONTENANT.

5

La présente invention a pour objet de nouveaux  
peptides présentant des propriétés antimicrobiennes, des  
polypeptides comprenant lesdits peptides, des  
polynucléotides codant lesdits peptides, des gènes  
10 chimères, des vecteurs contenant lesdits polynucléotides ou  
lesdits gènes chimères et des organismes transformés.  
L'invention concerne également des compositions  
antimicrobiennes contenant lesdits peptides utilisables en  
thérapie humaine et animale, en agriculture ainsi que dans  
15 l'industrie agroalimentaire et phytosanitaire.

Tant en santé humaine et animale qu'en santé  
végétale, le besoin de nouvelles molécules permettant de  
lutter contre les infections d'origine bactérienne et  
20 fongique est grandissant. En santé humaine, les infections  
nosocomiales d'origine bactérienne et fongique constituent  
des infections graves qui affectent les patients  
hospitalisés. Elles s'avèrent particulièrement redoutables  
pour les patients dont le système immunitaire est fragilisé  
25 suite à des traitements comme la corticothérapie ou la  
chimiothérapie, des interventions comme des  
transplantations ou des maladies affectant le système  
immunitaire comme le Syndrome d'ImmunoDéficience Acquise.  
La situation est particulièrement préoccupante pour les  
30 patients immunodéprimés infectés par des bactéries à Gram  
positif de genre *Enterococcus*. Les *Enterococci* ont été  
reconnus depuis ces 2 dernières décennies comme étant la  
principale cause du développement de bactéricémies,

d'infections urinaires et d'infections intra-abdominales chez les patients hospitalisés (Pathogenicity of *Enterococci*, Lynn E. Hancock and Michael S. Gilmore, *Gram-Positive Pathogens*, ASM Publications 2000). Parmi les

5 *Enterococci* les plus pathogènes, on répertorie notamment les espèces *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium*. *Enterococcus faecalis* est à lui seul responsable d'environ 80% des infections nosocomiales mentionnées précédemment. Les infections causées par les bactéries de genre

10 *Enterococcus* sont particulièrement difficiles à traiter. Les *Enterococci* tolèrent une large variété de conditions de croissance. Ils présentent notamment la capacité de croître dans des environnements hypotoniques, hypertoniques, acides, alcalins et dans des environnements dont la gamme

15 de température s'échelonne entre 10 et 45°C. L'azide de sodium et les sels biliaires qui inhibent la croissance voire détruisent la plupart des microorganismes, sont tolérés par les *Enterococci*. Les composés antibactériens les plus communément utilisés à l'heure actuelle sont ou

20 dérivent de substances naturelles produites par des bactéries, des actinomycètes et des champignons. Ces composés antibactériens sont regroupés selon les principales classes qui suivent : les  $\beta$ -lactams incluant les pénicillines, la méthicilline, les céphalosporines et

25 les monobactames ; les aminoglycosides incluant la streptomycine, la gentamicine, la néomycine, la tobramycine, la nétilmycine et l'amikacine ; les tétracyclines incluant la minocycline et la doxycycline ; les sulfonamides et trimethoprimés ; les fluoroquinolones

30 incluant la ciprofloxacine, la norfloxacine et l'ofloxacine ; les macrolides incluant l'érythromycine, l'azithromycine et la clarithromycine ; les quinolones incluant la ciprofloxacine ; les polymyxines ; les glycopeptides incluant la vancomycine ; les polymyxines ;

les lincosamides ; et le chloramphénicol. Les *Enterococci* ont naturellement développé des mécanismes de résistance contre la plupart des antibactériens classiques et notamment contre les  $\beta$ -lactams de type pénicilline et céphalosporines, contre les aminoglycosides de type gentamycine, contre les quinolones, contre les glycopeptides de type vancomycine, contre les tétracyclines, contre les macrolides de type érythromycine, contre le chloramphénicol et contre l'ampicilline (Diversity among Multidrug-Resistant *Enterococci*, Barbara E. Murray, *Emerging Infectious Diseases*, Vol.4, No.1, January-March 1998). Pour exemple, le pourcentage d'infections nosocomiales causées aux Etats-Unis par les *Enterococci* résistants à la vancomycine a augmenté de plus d'un facteur 20 entre 1989 et 1993 soit de 0,3% à 7,9% (Multiple-Drug Resistant *Enterococci* : The Nature of the Problem and an Agenda for the Future, Mark M. Huycke, Daniel F. Sahm and Michael S. Gilmore, *Emerging Infectious Diseases*, Vol.4, No.2, April-June 1998).

20

Des peptides présentant des propriétés antimicrobiennes sont produits par une grande variété d'espèces tant animales que végétales, chez lesquelles ils participent à des mécanismes non spécifiques de défense contre les infections (Antimicrobial peptides of multicellular organisms, Zasloff M., *Nature* Vol.415, Jan 2002, 389-395).

Les insectes ont notamment développé un système de défense efficace contre les microorganismes. Cette réponse immunitaire s'appuie pour une large part sur la synthèse rapide et transitoire de peptides antimicrobiens à large spectre d'activité (Antimicrobial peptides in insects ; structure and function, Bulet P. and al., *Dev. Comp. Immunol.* 23, 1999, 329-344). Parmi les peptides

d'insectes qui présentent des propriétés contre les bactéries à Gram positif, on répertorie notamment les cécropines, les défensines, la thanatine et la moricine. Les cécropines sont des peptides isolés à partir de diptères et de lépidoptères qui présentent une structure tridimensionnelle du type comportant 2 hélices  $\alpha$  amphipatiques (Amphipatic,  $\alpha$ -helical antimicrobial peptides, Tossi A., Sandri L., Giangaspero A., *Biopolymers*, Vol. 55, 4-30 (2000); WO 89/00194). Les défensines d'insectes sont des peptides isolés à partir d'ordres variés d'insectes qui présentent une structure tridimensionnelle du type comportant une hélice  $\alpha$  et 2 brins  $\beta$  antiparallèles reliés par 3 ponts disulfure (EP 0349451 ; WO 90/13646 ; EP 0546213 ; FR 2695392 ; EP 0607080 ; WO 97/02286). La thanatine est un peptide isolé à partir de l'hémiptère *Podisus maculiventris* qui présente une structure tridimensionnelle du type  $\beta$  hairpin-like comportant deux brins  $\beta$  antiparallèles reliés par un pont disulfure (WO 99/24594). La moricine est un peptide isolé à partir du lépidoptère de la famille des *Bombycidae*, *Bombyx mori* (JP 08119995 ; JP 11215983). Parmi les peptides précédemment énumérés, aucun n'a été décrit comme présentant une activité contre les bactéries à Gram positif de genre *Enterococcus*.

25

Le problème technique posé par la présente invention consiste à caractériser de nouveaux composés présentant des propriétés antifongiques et/ou antibactériennes et plus particulièrement contre les bactéries à Gram positif de genre *Enterococcus* responsables d'infections opportunistes graves chez l'homme et/ou les animaux.

30

Par « antibactérien », on entend selon la présente invention, toute molécule présentant des propriétés bactériostatiques et/ou bactéricides. Par « antifongique », on entend selon la présente invention, toute molécule présentant des propriétés fongistatiques et/ou fongicides.

Dans les séquences peptidiques rapportées ci-après, les acides aminés sont représentés par leur code à une lettre, mais ils peuvent être aussi représentés par leur code à trois lettres selon la nomenclature ci-dessous.

	A	Ala	alanine
	C	Cys	cystéine
	D	Asp	acide aspartique
15	E	Glu	acide glutamique
	F	Phe	phénylalanine
	G	Gly	glycine
	H	His	histidine
	I	Ile	isoleucine
20	K	Lys	lysine
	L	Leu	leucine
	M	Met	méthionine
	N	Asn	asparagine
	P	Pro	proline
25	Q	Gln	glutamine
	R	Arg	arginine
	S	Ser	sérine
	T	Thr	thréonine
	V	Val	valine
30	W	Trp	tryptophane

Y Tyr tyrosine

La Demanderesse a maintenant isolé, purifié et caractérisé de nouveaux peptides à partir de l'hémolymphe de larves immunisées du lépidoptère de la famille des *Nymphalidae*, *Caligo illioneus* (Figure 1). Les lépidoptères de la famille des *Nymphalidae* ont une activité diurne et se caractérisent par la présence d'antennes se terminant en forme de massue, de couleurs vives avec motifs et d'ailes verticales au repos.

Les peptides isolés par la Demanderesse à partir de l'hémolymphe de larves immunisées du lépidoptère *Caligo illioneus* répondent à la formule (I) :

Xaa-Lys-Ile-Pro-Xab-Ala-Xac-Lys-Gly-Ala-Xad-Arg-Ala-Leu-Xae-Ala-Ser-Thr-Ala-Xaf-Asp-Ile-Ala-Xag-Phe-Xah-Arg-Lys-Arg-Xai (I)

dans laquelle,

Xaa est -NH<sub>2</sub> ou le reste peptidique Arg ou Gly,  
Xab est le reste peptidique Ile-Asn ou Val-Glu,  
Xac est le reste peptidique Ile-Lys, Ile-Arg ou Leu-Lys,

Xad est le reste peptidique Ser-Arg-Ala-Trp, Lys-Ala-Val-Gly-His-Gly-Leu ou Lys-Val-Ala-Gly-Arg-Ala-Trp,

Xae est le reste peptidique Asp-Leu, Asn-Ile ou Asp-Leu,

Xaf est le reste peptidique Tyr ou His,

Xag est le reste peptidique Ser-Ile, Ser-Ala ou His-Leu,

Xah est le reste peptidique Asn, Asp ou His,

Xai est -OH ou le reste peptidique Glu, Asn ou Lys-His.

La présente invention a donc pour principal objet un peptide isolé répondant à la formule (I):

Xaa-Lys-Ile-Pro-Xab-Ala-Xac-Lys-Gly-Ala-Xad-Arg-Ala-Leu-  
Xae-Ala-Ser-Thr-Ala-Xaf-Asp-Ile-Ala-Xag-Phe-Xah-Arg-Lys-  
5 Arg-Xai (I) dans laquelle Xaa, Xab, Xac, Xad, Xae, Xaf,  
Xag, Xah et Xai sont tels que définis précédemment, ses  
dérivés et ses fragments.

La formule (I) correspond à la séquence SEQ ID  
NO :1 dans le listage de séquences en annexe.

10

La présente invention concerne plus particulièrement un peptide isolé répondant à l'une des séquences suivantes :

- ETD-P1646 G K I P I N A I R K G A K A V G H  
15 G L R A L N I A S T A H D I A S A F H R K R K H (SEQ ID  
NO :2 dans le listage de séquences en annexe)

- ETD-P1647 R K I P V E A I K K G A S R A W R  
A L D L A S T A Y D I A S I F N R K R E (SEQ ID NO :3 dans  
le listage de séquences en annexe)

20 - ETD-P1648 G K I P V E A L K K G A K V A G R  
A W R A L D L A S T A Y D I A H L F D R K R N (SEQ ID NO :4  
dans le listage de séquences en annexe),  
ses dérivés et ses fragments.

25 A titre de dérivés des peptides de l'invention,  
on peut citer les peptides qui présentent une modification  
post-traductionnelle et/ou modification chimique en  
particulier une glycosylation, une amidation, une  
acylation, une acétylation, une méthylation ainsi que les  
30 peptides qui portent un groupement protecteur. On entend  
par « groupement protecteur » selon la présente invention,  
tout groupement permettant d'éviter la dégradation desdits  
peptides.

Les dérivés des peptides de l'invention peuvent également être ceux dont un ou plusieurs acides aminés sont des énantiomères, des diastéréoisomères, des acides aminés naturels de conformation D, des acides aminés rares  
 5 notamment l'hydroxyproline, l'hydroxylysine, l'allo-hydroxylysine, la 6-N-méthyllysine, la N-éthylglycine, la N-méthylglycine, la N-éthylasparagine, l'allo-isoleucine, la N-méthylisoleucine, la N-méthylvaline, la pyroglutamine, l'acide aminobutyrique et les acides aminés synthétiques  
 10 notamment l'ornithine, la norleucine, la norvaline, la cyclohexyl-alanine et les oméga-acides aminés. Les dérivés couvrent également les rétropheptides et les rétroversopeptides, de même que les peptides dont la chaîne latérale d'un ou plusieurs des acides aminés est substituée  
 15 par des groupements qui ne modifient pas l'activité antimicrobienne des peptides de l'invention.

A titre de fragments des peptides de l'invention, on entend des fragments d'au moins 5 acides  
 20 aminés qui présentent une activité antimicrobienne. L'activité antimicrobienne des dérivés et des fragments des peptides de l'invention peut être mise en évidence grâce aux tests *in vitro* décrits ci-après dans l'exemple 4.

25 L'invention concerne aussi un polypeptide comprenant un peptide de l'invention. L'invention envisage plus particulièrement un polypeptide comprenant un peptide de l'invention dont l'une et/ou l'autre des extrémités dudit peptide comprend un ou plusieurs acides aminés  
 30 nécessaires à son expression et/ou à son ciblage dans un organisme hôte.

L'invention concerne également un polynucléotide isolé codant un peptide ou un polypeptide de

l'invention. On entend par « polynucléotide » selon la présente invention, une séquence nucléique de type ADN ou ARN, de préférence ADN, notamment double brin.

5 L'invention concerne également les polynucléotides isolés qui comprennent des modifications au niveau d'un ou plusieurs nucléotides résultant de la dégénérescence du code génétique et qui codent une même séquence d'acides aminés des peptides ou polypeptides de l'invention.

10 L'invention couvre également les polynucléotides isolés codant les peptides ou les polypeptides de l'invention et capables de s'hybrider dans des conditions stringentes aux dits peptides ou polypeptides. On entend par « condition stringentes » selon  
15 la présente invention, les conditions enseignées par Sambrook et al. (Molecular cloning, 1989, Noland C. ed., New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press).

L'invention couvre également les séquences nucléotidiques complémentaires des polynucléotides isolés  
20 définis ci-dessus ainsi que les ARN correspondants.

L'invention concerne également un gène chimère comprenant au moins, liés entre eux de façon opérationnelle, un promoteur constitutif ou inductible  
25 fonctionnel dans un organisme hôte, un polynucléotide codant un peptide ou un polypeptide de l'invention et un élément terminateur fonctionnel dans un organisme hôte. On entend par « liés entre eux de façon opérationnelle » selon l'invention, des éléments liés entre eux de façon à ce que  
30 le fonctionnement d'un des éléments est affecté par celui d'un autre. A titre d'exemple, un promoteur est lié de façon opérationnelle à une séquence codante lorsqu'il est capable d'affecter l'expression de cette dernière. L'ensemble des éléments régulateurs de la transcription, de

la traduction et de la maturation de peptides ou polypeptides que le gène chimère peut comprendre est connu de l'homme du métier et ce dernier est capable de les choisir en fonction de l'organisme hôte. Le gène chimère  
5 peut notamment comprendre à titre d'élément régulateur additionnel, des séquences codant pour un peptide signal ou de transit de façon à diriger la sécrétion du peptide ou polypeptide de l'invention dans l'organisme hôte. Lorsque l'organisme hôte est une levure, ces séquences sont  
10 préférentiellement les séquences pré de BGL2 et pro de MFα1 qui permettent la sécrétion du peptide ou polypeptide de l'invention directement dans le milieu de culture. Le gène chimère peut en outre comprendre des séquences codant une endoprotéase pour augmenter l'activité protéolytique  
15 dans l'organisme hôte durant le processus de sécrétion. Lorsque l'organisme hôte est une levure, ces séquences sont préférentiellement les séquences du gène KEX2 codant l'endoprotéase yscf qui permet de cliver la séquence pro du pré-pro-peptide de l'invention durant le processus de  
20 sécrétion.

L'invention concerne également un vecteur de clonage et/ou d'expression caractérisé en ce qu'il contient un polynucléotide ou un gène chimère selon l'invention pour  
25 transformer un organisme hôte et exprimer dans ce dernier un peptide ou polypeptide de l'invention. Le vecteur peut être un plasmide, un cosmide, un bactériophage ou un virus en particulier un baculovirus. Le vecteur est avantageusement un vecteur à répllication autonome  
30 comportant des éléments permettant son maintien et sa répllication dans l'organisme hôte comme une origine de répllication. En outre, le vecteur peut comporter des éléments permettant sa sélection dans l'organisme hôte comme par exemple un gène de résistance à un composé

antibactérien ou un gène de sélection qui assurent la complémentation avec le gène respectif délété au niveau du génome de l'organisme hôte. Le vecteur peut également être un vecteur navette comportant des éléments permettant son maintien et sa réplication dans chacun des organismes hôte et des éléments permettant sa sélection dans chacun des organismes hôte. De tels vecteurs de clonage et/ou d'expression sont bien connus de l'homme du métier et largement décrits dans la littérature.

10

L'invention concerne également un organisme hôte transformé par un vecteur de l'invention. Par « organisme hôte » selon la présente invention, on entend tout organisme uni- ou pluricellulaire, inférieur ou supérieur, dans lequel un polynucléotide ou un gène chimère de l'invention est introduit pour la production d'un peptide ou polypeptide de l'invention. Selon une forme préférée de l'invention, l'organisme hôte est un microorganisme tel qu'une levure, une bactérie ou un champignon. La transformation de tels microorganismes permet de produire les peptides ou polypeptides de l'invention à échelle semi-industrielle ou industrielle. A titre de bactérie, l'invention envisage plus particulièrement la bactérie de l'espèce *Escherichia coli*. A titre de levure, l'invention envisage plus particulièrement une levure du genre *Saccharomyces*, de préférence de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*, du genre *Kluyveromyces*, de préférence de l'espèce *Kluyveromyces lactis*, du genre *Hansenula*, de préférence de l'espèce *Hansenula polymorpha*, du genre *Pichia*, de préférence de l'espèce *Pichia pastoris* ou du genre *Schizosaccharomyces*, de préférence de l'espèce *Schizosaccharomyces pombe*. A titre de champignon, l'invention envisage plus

30

particulièrement le champignon filamenteux de l'espèce *Aspergillus nidulans*.

5 Selon une autre forme de l'invention, l'organisme hôte est un animal, en particulier une cellule d'arthropode (par exemple une cellule de *Spodoptera frugiperda* ou de *Trichoplusia ni*) ou une cellule de mammifère.

10 Selon une autre forme de l'invention, l'organisme hôte est une cellule végétale ou une plante. Par « cellule de plante », on entend, selon la présente invention, toute cellule issue d'une plante et pouvant constituer des tissus indifférenciés tels que des cals, des  
15 tissus différenciés tels que des embryons, des parties de plantes, des plantes ou des semences. Par « plante », on entend selon l'invention, tout organisme pluricellulaire différencié capable de photosynthèse, en particulier monocotylédones ou dicotylédones, plus particulièrement des  
20 plantes de culture destinées ou non à l'alimentation animale ou humaine.

25 Les peptides de l'invention sont également utiles pour conférer aux plantes un caractère de résistance aux maladies bactériennes et/ou fongiques. L'invention concerne donc également une cellule végétale ou une plante résistante aux maladies bactériennes et/ou fongiques  
30 comprenant un polynucléotide ou un gène chimère de l'invention et exprimant un peptide ou polypeptide de l'invention.

30 Les peptides ou polypeptides de l'invention peuvent aussi être synthétisés chimiquement selon des techniques connues de l'homme du métier.

Les peptides de l'invention ont été testés pour leurs activités antimicrobiennes. Les tableaux 1 et 2 ci-après exposent respectivement les activités antibactériennes *in vitro* (IC90 µg/ml) et les activités antifongiques *in vitro* (CMI µg/ml) des peptides de l'invention.

Tableau 1

IC90 µg/ml	Gram positif			Gram négatif
	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>P. aeruginosa</i>
ETD-P1646	16	8	8-4	> 64
ETD-P1647	16	8	8	> 64
ETD-P1648	32	8	8	> 64

10

Tableau 2

CMI µg/ml	Levures				Champignons filamenteux
	<i>Candida albicans</i>		<i>Candida glabrata</i>		<i>Aspergillus fumigatus</i>
	24h	48h	24h	48h	
ETD-P1646	8-4	16	> 64	> 64	> 40
ETD-P1647	64-32	ND	> 64	> 64	> 40
ETD-P1648	32-16	ND	> 64	> 64	> 40

ND : Non Déterminé

Les peptides de l'invention sont préférentiellement actifs contre les bactéries à Gram positif et plus particulièrement envers les bactéries du genre *Enterococcus*.

15

L'invention vise donc en outre la mise à profit des propriétés antimicrobiennes des peptides de l'invention pour prévenir et/ou traiter les infections bactériennes et/ou fongiques tant chez l'homme et l'animal que chez les  
5 plantes. L'invention concerne donc avantageusement l'utilisation des peptides de l'invention à titre de médicament en thérapie humaine et animale. Elle concerne également l'utilisation des peptides de l'invention pour le traitement des plantes contre les infections bactériennes  
10 et/ou fongiques, en appliquant lesdits peptides directement sur les plantes.

L'invention concerne donc une composition antibactérienne comprenant à titre d'agent actif au moins  
15 un peptide de l'invention avantageusement associé dans ladite composition à un véhicule acceptable. La composition antibactérienne peut en outre comprendre un autre agent antibactérien. Selon la présente invention, l'agent antibactérien est, de préférence, choisi parmi les  $\beta$ -  
20 lactams et plus particulièrement les pénicillines, méthicilline, céphalosporines et monobactames ; les aminoglycosides et plus particulièrement la streptomycine, gentamicine, néomycine, tobramycine, nétilmycine et amikacine ; les tétracyclines et plus particulièrement la  
25 minocycline et doxycycline ; les sulfonamides et trimethoprim ; les fluoroquinolones et plus particulièrement le ciprofloxacine, norfloxacine et ofloxacine ; les macrolides et plus particulièrement l'érythromycine, azithromycine et clarithromycine ; les  
30 quinolones et plus particulièrement la ciprofloxacine ; les polymyxines ; les glycoprotéines et plus particulièrement la vancomycine et teicoplanine ; lipopeptides et plus particulièrement la daptomycine ; les lincosamides ;

chloramphénicol ; et oxazolidinones et plus particulièrement le linezolide.

L'invention concerne aussi une composition  
5 antifongique comprenant à titre d'agent actif au moins un peptide de l'invention avantageusement associé dans ladite composition à un véhicule acceptable. La composition antifongique peut, en outre, comprendre un autre agent antifongique. Selon la présente invention, l'agent  
10 antifongique est, de préférence, choisi parmi les dérivés polyènes et, plus particulièrement l'amphotéricine B, nystatine et pimaricine ; les dérivés azolés et plus particulièrement le ketoconazole, clotrimazole, miconazole, econazole, butoconazole, oxiconazole, sulconazole, tioconazole, terconazole, fluconazole et itraconazole ; les  
15 allyliques-thiocarbamates et plus particulièrement le tolnaftate, naftifine et terbinafine ; 5-fluorocytosine ; echinocandins ; griseofulvine ; ciclopirox ; et haloprogrine.

20

Par « véhicule », on entend selon la présente invention, toute substance qui est ajoutée au(x) peptide(s) de l'invention pour favoriser le transport du ou des peptides, éviter sa dégradation substantielle dans ladite  
25 composition et préserver ses propriétés antimicrobiennes. Le véhicule est choisi en fonction du type d'application de la composition. Notamment, lorsque la composition est appliquée à un usage pharmaceutique en santé humaine et animale, le véhicule est un véhicule pharmaceutiquement acceptable adapté à une administration du peptide de  
30 l'invention par voie topique, per os ou par injection. Lorsque la composition est appliquée à un usage cosmétique, le véhicule est un véhicule cosmétiquement acceptable adapté à une administration sur la peau ou les phanères.

Lorsque la composition est appliquée à un usage agrochimique, le véhicule est un véhicule agrochimiquement acceptable adapté à une administration sur les plantes ou à proximité des plantes sans les dégrader.

5

Les peptides ou la composition de l'invention présentent également un intérêt dans l'industrie agroalimentaire. Leur utilisation permet notamment d'empêcher la contamination par les bactéries, les levures et/ou les champignons pendant la fabrication de produits alimentaires et après leur fabrication pour leur conservation.

Dans l'industrie phytosanitaire, les peptides ou la composition de l'invention peuvent également être utilisés pour la fabrication des produits phytosanitaires en lieu et place des produits usuels.

D'autres avantages et caractéristiques des peptides de l'invention apparaîtront des exemples qui suivent concernant leur préparation et leurs activités antimicrobiennes et dans lesquels il sera fait référence aux dessins en annexe dans lesquels :

-la figure 1 représente le lépidoptère *Caligo illioneus* (famille des Nymphalidae ; sous-famille des *Brassolinae*) à partir duquel les peptides de l'invention ont été isolés.

I. Exemple 1 : Isolement des peptides ETD-P1646, ETD-P1647 et ETD-P1648 à partir de l'hémolymphe prélevée chez des larves immunisées du lépidoptère *Caligo illioneus*.

1) Induction de la synthèse biologique de substances antimicrobiennes dans l'hémolymphe de *Caligo illioneus*.

Les larves matures de dernier stade du  
5 lépidoptère *Caligo illioneus* ont été immunisées par  
injection d'une solution de PBS contenant des bactéries à  
Gram positif (*Micrococcus luteus* et *Staphylococcus aureus*)  
et à Gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa*), des spores de  
champignons filamenteux (*Aspergillus fumigatus*) et des  
10 levures (*Candida albicans*). Les bactéries sont préparées à  
partir de cultures réalisées en milieu de Luria-Bertani  
durant 12 heures à 37°C. Les levures sont préparées à  
partir de cultures réalisées en milieu de Sabouraud durant  
12 heures à 30°C. Les spores d'*A. fumigatus* sont prélevées  
15 d'un stock congelé à -80°C. Les animaux ainsi infectés ont  
été conservés pendant 24 heures sur leur plante hôte, dans  
un espace ventilé. Avant le prélèvement de l'hémolymphe,  
les larves ont été refroidies sur de la glace.

2) Préparation du plasma.

20 L'hémolymphe de *C. illioneus* (28 ml) a été  
collectée par piqure latérale au niveau de la tête suivie  
d'une pression manuelle et recueillie dans des tubes de  
microcentrifugation en polypropylène de 1,5 ml refroidis  
dans de la glace et contenant de l'aprotinine comme  
25 inhibiteur de protéases (20 µg/ml en concentration finale)  
et de la phénylthiourée comme inhibiteur de la mélanisation  
(concentration finale de 40 µM). L'hémolymphe ainsi  
collectée à partir des larves immunisées a été centrifugée  
à 8000 rpm pendant 1 min à 4°C afin d'éliminer les  
30 hémocytes. Le surnageant de centrifugation a été alors  
centrifugé à 12000 rpm. L'hémolymphe dépourvue des cellules  
sanguines a été conservée à -80°C jusqu'à son utilisation.

### 3) Acidification du plasma.

Après décongélation rapide, le plasma de *C. illioneus* a été acidifié à pH 3 avec une solution d'acide trifluoroacétique à 1% (volume à volume) contenant de l'aprotinine (20 µg/ml en concentration finale) et la phénylthiourée (concentration finale de 40 µM). L'extraction en condition acide des peptides a été réalisée pendant 30 min sous agitation légère dans un bain d'eau glacée. L'extrait obtenu a été ensuite centrifugé à 4°C pendant 30 min à 10000g.

### 4) Purification des peptides.

#### a) Prépurification par extraction en phase solide.

Une quantité d'extrait équivalente à 6 ml d'hémolymphe de *C. illioneus* a été déposée sur un support de 5 g de phase inverse tel que commercialisé sous la forme de cartouche (Sep-Pak<sup>™</sup> C<sub>18</sub>, Waters Associates), équilibré avec de l'eau acidifiée (TFA 0,05%). Les molécules hydrophiles ont été éliminées par un simple lavage avec de l'eau acidifiée. L'élution du peptide a été réalisée par une solution à 60% d'acétonitrile dans de l'eau contenant 0,05% de TFA. La fraction éluée avec 60% d'acétonitrile a été séchée sous vide dans le but d'éliminer l'acétonitrile et le TFA puis elle a été reconstituée dans de l'eau acidifiée (TFA 0,05%) stérile avant d'être soumise à la première étape de purification. L'étape 4 a) a été répétée une fois afin d'obtenir la fraction éluée avec 60% d'acétonitrile en quantité plus importante.

#### b) Purification par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) sur colonne de phase inverse.

Première étape : l'élution 60% issue de l'extraction en phase solide décrite ci-dessus contenant le peptide a été fractionnée par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) en phase inverse sur une colonne

semi-préparative de marque Interchim<sup>™</sup>, de type Modulocart Uptiprep, de taille 250 x 10 mm, de porosité 300 Å et de granulométrie 15 µm avec un greffage C8. Le fractionnement a été réalisé par un gradient d'acétonitrile/0,05% TFA  
 5 contre H<sub>2</sub>O/0,05% TFA de 5 à 60% en 50 minutes à un débit constant de 2,5 ml/min. Les fractions ont été collectées automatiquement (collecteur Gilson<sup>™</sup> de type FC 204) dans les 80 premiers puits (colonnes A à J) d'une plaque 96-  
 10 puits (Contenance maximale de chaque puits : 2 ml). La collecte se fait par unité de temps et le volume collecté est d'environ 1,6 ml. Les fractions recueillies ont été asséchées sous vide, reconstituées avec de l'eau ultrapure et analysées pour leurs activités antimicrobiennes en utilisant les tests décrits ci-dessous. L'étape a été  
 15 répétée une fois afin d'obtenir des fractions actives en quantité plus importante.

Seconde étape : les fractions 37 et 45 issues de l'étape précédente présentant une activité contre les bactéries à Gram positif dans les étapes de purification  
 20 précédemment décrites, éluées à un pourcentage d'acétonitrile égal respectivement à 30 et 35, ont été purifiées de manière plus fine sur une colonne analytique de phase inverse de greffage C18 de type Modulocart Uptisphère (Interchim<sup>™</sup>, 250 x 4,6 mm, 300 Å et 5 µm), en  
 25 utilisant un gradient linéaire diphasique d'acétonitrile/0,05% TFA contre H<sub>2</sub>O/0,05% TFA. Par exemple, pour une fraction élue à 30% (35%) d'acétonitrile, le gradient utilisé va de 2 à 26% (31%) en 10 min et de 26 (31%) à 34% (39%) en 45 min, avec un débit constant de 0,8  
 30 ml/min. Les fractions ont été collectées manuellement en suivant la variation de l'absorbance à 225 nm. Les fractions recueillies ont été asséchées sous vide, reconstituées avec de l'eau ultrapure et analysées pour leurs activités contre les bactéries à Gram positif dans

les conditions décrites ci-dessous. L'activité a été retrouvée dans certaines sous-fractions des fractions décrites ci-dessus.

Troisième étape : les fractions décrites ci-dessus, contenant les peptides ont été purifiées jusqu'à homogénéité sur une colonne de phase inverse de marque Interchim<sup>™</sup> de type Modulocart Uptisphère (greffage C18, granulométrie 3 Å, de taille 150 x 2 mm) en utilisant un gradient linéaire diphasique d'acétonitrile/0,05% TFA contre H<sub>2</sub>O/0,05% TFA (gradient dépendant du pourcentage d'élution en acétonitrile de la sous-fraction à purifier), avec un débit constant de 0,2 ml/min à une température contrôlée de 30°C. Les fractions ont été collectées manuellement en suivant la variation de l'absorbance à 225 nm. Les fractions recueillies ont été asséchées sous vide, reconstituées avec de l'eau ultrapure filtrée et analysées pour leurs activités contre les bactéries à Gram positif.

## II. Exemple 2 : Caractérisation structurale des peptides ETD-P1646, ETD-P1647 et ETD-P1648.

### 1) Vérification de la pureté par Spectrométrie de masse MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight).

Le contrôle de pureté a été effectué sur un spectromètre de masse MALDI-TOF Bruker Biflex (Bremen, Allemagne) en mode linéaire positif (voir section 3 ci-dessous).

### 2) Réduction et S-pyridyléthylation en vue de la détermination du nombre de cystéines.

Le nombre de résidus cystéine a été déterminé sur les peptides natifs par réduction et S-pyridyléthylation. 400 pmoles de peptide natif ont été réduites dans 40 µl de tampon Tris/HCl 0,5 M, pH 7,5 contenant 2 mM d'EDTA et 6 M de chlorure de guanidinium en

présence de 2  $\mu$ l de dithiothréitol 2,2 M. Le milieu réactionnel a été placé sous atmosphère d'azote. Après 60 min d'incubation à l'obscurité, 2  $\mu$ l de 4-vinylpyridine fraîchement distillée ont été ajoutés à la réaction qui a  
 5 été alors incubée durant 10 min à 45°C à l'obscurité et sous atmosphère d'azote. Le peptide S-pyridyléthylé a été ensuite séparé des constituants du milieu réactionnel par chromatographie de phase inverse sur une colonne analytique de phase inverse Aquapore RP-300 C<sub>8</sub> (Brownlee<sup>®</sup>, 220 x 4,6  
 10 mm, 300 Å), en utilisant un gradient linéaire d'acétonitrile/0,05% TFA contre H<sub>2</sub>O/0,05%TFA de 2 à 52% pendant 70 min.

3) Détermination de la masse du peptide natif, du peptide S-pyridyléthylé et des fragments de protéolyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight).  
 15

Les mesures de masses ont été effectuées sur un spectromètre de masse MALDI-TOF Bruker Biflex (Bremen, Allemagne) en mode linéaire positif. Les spectres de masse  
 20 ont été calibrés de façon externe avec un mélange standard de peptides de m/z connues, respectivement 2199,5 Da, 3046,4 Da et 4890,5 Da. Les différents produits à analyser ont été déposés sur une fine couche de cristaux d'acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique obtenue par une évaporation  
 25 rapide d'une solution saturée dans l'acétone. Après séchage sous un léger vide, les échantillons ont été lavés par une goutte d'acide trifluoroacétique à 0,1% avant d'être introduits dans le spectromètre de masse. La différence de masse observée entre le peptide S-pyridyléthylé et le  
 30 peptide natif permet de déterminer le nombre de résidus cystéine présents dans chacun des peptides.

4) Séquençage par dégradation d'Edman.

Le séquençage automatique par dégradation d'Edman des peptides natifs, des peptides S-pyridyléthylés

et des différents fragments obtenus après les différents clivages protéolytiques et la détection des dérivés phénylthiohydantoïnes ont été réalisés sur un séquenceur de type Procise HT sequencing system, modèle 492 de marque  
 5 Applied Biosystem.

#### 5) Clivages protéolytiques.

Confirmation des séquences peptidiques dans la région C-terminale. 200 pmoles de peptide réduit et S-pyridyléthylé ont été incubées en présence de 5 pmoles  
 10 d'endoprotéinase-Asp-N (*Endoproteinase Asp-N*, clivage spécifique des résidus acide aspartique du côté N-terminal, Takara, Otsu) selon les conditions préconisées par le fournisseur (tampon phosphate de sodium 20 mM, pH 8,9, en présence de Tween 20 à 0,01%) pendant 16 heures. Après  
 15 arrêt de la réaction avec du TFA 1%, les fragments peptidiques ont été séparés par HPLC en phase inverse sur une colonne de marque Interchim<sup>®</sup> de type Modulocart Uptisphère (greffage C18, granulométrie 3 Å, de taille 150 x 2 mm) avec un gradient linéaire d'acétonitrile/0,05% TFA  
 20 contre H<sub>2</sub>O/0,05% TFA de 2 à 60% en 80 min avec un débit de 0,2 ml/min et une température constante de 37°C. Les fragments obtenus ont été analysés par spectrométrie de masse MALDI-TOF et le peptide correspondant au fragment C-terminal a été séquencé par dégradation d'Edman.

25

La séquence primaire du peptide ETD-P1646 est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO: 2. La masse moléculaire du peptide ETD-P1646 natif est de 4383 Da et la masse moléculaire du  
 30 peptide ETD-P1646 S-pyridyléthylé est de 4384 Da.

La séquence primaire du peptide ETD-P1647 est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO: 3. La masse moléculaire du peptide ETD-

P1647 natif est de 4202 Da et la masse moléculaire du peptide ETD-P1647 S-pyridyléthylé est de 4205 Da.

La séquence primaire du peptide ETD-P1648 est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le  
 5 numéro SEQ ID NO: 4. La masse moléculaire du peptide ETD-P1648 natif est de 4408 Da et la masse moléculaire du peptide ETD-P1648 S-pyridyléthylé est de 4410 Da.

10 III. Exemple 3 : Production des peptides ETD-P1646, ETD-P1647 et ETD-P1648.

Les peptides ETD-P1646, ETD-P1647 et ETD-P1648 ont été synthétisés chimiquement (Altergen).

15 IV. Exemple 4 : Tests d'activité antimicrobienne in vitro.

1) Tests antibactériens.

Les activités antibactériennes ont été évaluées *in vitro* par détermination de l'IC90 (Inhibition de Croissance  $\geq$  à 90%).

20 Les tests ont été réalisés sur les souches bactériennes suivantes :

-Bactéries à Gram positif : *Staphylococcus aureus* (souche 21; Don de l'Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Strasbourg), *Enterococcus faecalis* (souche  
 25 clinique 17; Don du Dr. G. Prevot, Institut de Bactériologie, Strasbourg) et *Enterococcus faecium* (souche clinique 18; Don du Dr. G. Prevot, Institut de Bactériologie, Strasbourg) ;

- Bactéries à Gram négatif : *Pseudomonas aeruginosa* (Don de  
 30 l'Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Strasbourg). Toutes ces souches sont sensibles aux antibactériens communément utilisés en milieu hospitalier.

a) Préparation des suspensions bactériennes.

Une préculture de 4 ml en milieu LB a été préparée par ensemencement d'une colonie de la souche bactérienne d'intérêt. La préculture a été incubée à 35-37°C sous agitation pendant 6h. La concentration de la préculture a été évaluée par mesure de la densité optique à 600-620 nm suivant la relation densité bactérienne=f(DO). La concentration a été ajustée par dilution de façon à obtenir une suspension de  $2.10^6$ /ml en concentration finale. La concentration de la suspension bactérienne a été contrôlée par dénombrement des Unités Formant Colonies (UFC). La suspension bactérienne à  $2.10^6$ /ml a été diluée en cascade ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ , ...  $10^{-6}$ ) puis 100  $\mu$ l des dilutions  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  et  $10^{-4}$  ont été étalés sur des boîtes de gélose LB agar. Les boîtes ont été incubées à 35-37°C pendant 16 à 18h puis les UFC ont été dénombrées.

b) Détermination des IC90.

Les IC90 ont été déterminées par un test liquide en microplaques de 96 puits. 100  $\mu$ l d'échantillon à tester ont été distribués en duplicats de façon à obtenir une gamme de concentrations finales de 64 à 0.125  $\mu$ g/ml dans les puits. 100  $\mu$ l de suspension bactérienne à  $2.10^6$ /ml ont été ajoutés dans chaque puits de façon à obtenir une concentration finale de  $10^6$ /ml. Les plaques de microtitration ont été incubées à 30-35°C pendant 16 à 18h. La densité optique des puits a été mesurée à 600-620 nm et les résultats ont été interprétés en calculant le pourcentage de pousse dans chaque puits selon la formule : %Pousse= (DO puits - DO du TS)/(DO du TP - DO du TS)\*100 où DO du TP= DO du témoin de pousse (suspension bactérienne sans échantillon à tester), DO du TS= DO du témoin de stérilité (milieu de culture sans bactéries) et DO puits= DO du puits dont on souhaite calculer le pourcentage de pousse (suspension bactérienne + échantillon à tester).

L'IC90 correspond au puits où le pourcentage de pousse est inférieur ou égal à 10%. Les résultats des activités antibactériennes (IC90) sont présentés dans le tableau 1 exposée dans la description.

5

## 2) Tests antifongiques.

Les activités antifongiques ont été évaluées *in vitro* par détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI).

Les tests ont été réalisés sur les souches de levures suivantes : *Candida albicans* (souche IHEM 8060; Don du Dr. H. Koenig, Hôpital civil, Strasbourg) et *Candida glabrata* (souche patient 1 ; Don du Dr. H. Koenig, Hôpital civil, Strasbourg) ainsi que sur les champignons filamenteux suivants : *Aspergillus fumigatus* (souche GASP 4707; Don du Dr. H. Koenig, Hôpital civil, Strasbourg).

Toutes ces souches sont sensibles aux antifongiques communément utilisés en milieu hospitalier.

### a) Préparation des suspensions fongiques.

#### a-1) Préparation des suspensions de levures.

20

Une anse de levures prélevée à partir d'un stock de levures en suspension à 4°C a été étalée sur une boîte de gélose Sabouraud Agar. La boîte a été incubée à 30°C pendant 24 à 48h. Quelques colonies de levures ont été prélevées et mises en suspension dans 10 ml de milieu Sabouraud liquide. La suspension de levure obtenue qui doit être « laiteuse » a été diluée (1 ml qsp 10 ml de milieu Sabouraud). La concentration de la suspension a été évaluée par mesure de la densité optique à 600 nm suivant la relation 0.1 DO à 600 nm correspond  $2,5 \cdot 10^6$  levures/ml. La concentration a été ajustée par dilution de façon à obtenir une suspension de  $2,5 \cdot 10^3$ /ml de concentration finale. La concentration de la suspension de levure a été contrôlée par dénombrement des Unités Formant Colonies (UFC). La suspension de levures à  $2,5 \cdot 10^3$ /ml a été diluée en cascade

( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ , ...  $10^{-6}$ ) puis 100  $\mu$ l de chaque dilution ont été étalés sur des boîtes de gélose Sabouraud. Les boîtes ont été incubées à 30°C pendant 24h puis les UFC ont été dénombrées.

5                    a-2) Préparation des suspensions de champignons filamenteux.

Les champignons ont été ensemencés sur des boîtes de gélose de malt-agar qui ont été incubées 5 à 7 jours à 37°C. Les spores formées ont été récoltées et mises  
10 en suspension dans du milieu YPG. La concentration de la suspension a été évaluée par comptage d'un aliquot sur une lamelle de comptage (Coverslide). La concentration a été ajustée par dilution de façon à obtenir une suspension de  $5.10^3$ /ml de concentration finale.

15                    b) Détermination des CMI.

Les CMI ont été déterminées par un test liquide sur microplaques de 96 puits selon les protocoles M27-A et M38-P du « National Committee for Clinical Standard » (NCCLS) à la différence près que le milieu RPMI-1640  
20 suggéré par le protocole NCCLS a été substitué par du milieu Sabouraud (Biomérieux) pour les tests sur les levures et par du milieu YPG (1 g peptone, 1 g yeast extract, 3 g glucose par litre) pour les tests sur les champignons filamenteux. Les activités des échantillons à  
25 tester ont été déterminées pour la gamme de concentrations finales 0.125 à 64  $\mu$ g/ml.

b-1) Détermination des CMI sur les levures.

La densité optique des microplaques a été mesurée à 600 nm avec un spectrophotomètre pour  
30 microplaques après 24 et 48h d'incubation pour les levures du genre *Candida*.

Le pourcentage de pousse (%pousse) a été calculé à partir des valeurs de densité optique (DO) mesurées selon la formule suivante :

$\%pousse = ((DO \text{ puits avec échantillon à tester} - DO \text{ milieu seul}) / (DO \text{ puits sans échantillon à tester} - DO \text{ milieu seul})) * 100.$

5 Les CMI ont été définies selon les scores suivants : CMI 0 :  $\%pousse \leq 10\%$  ; CMI 1 :  $10\% < \%pousse \leq 20\%$  ; CMI 2 :  $20\% < \%pousse \leq 50\%$  ; CMI 3 :  $> 50\%$ . La CMI a été déterminée dans l'intervalle de score CMI 0 et CMI 2.

b-2) Détermination des CMI sur les champignons filamenteux.

10 La CMI est déterminée par lecture à l'œil nu des microplaques après 48h d'incubation pour *Aspergillus fumigatus*.

15 Les CMI ont été définies selon les scores suivants : CMI 0 : pas de trace de champignons au fond du puits ; CMI 1 : un point au fond du puits ; CMI 2 : champignons sur la moitié de la surface du puits ; CMI 3 : les trois quarts du puits sont occupés par le champignon ; CMI 4 : ensemble du puits envahi de champignons. La CMI a été déterminée dans l'intervalle de score CMI 0 et CMI 2.

20 Les résultats des activités antifongiques (CMI) sont présentés dans le tableau 2 exposé dans la description.

## REVENDEICATIONS

1) Peptide isolé caractérisé en ce qu'il répond à la formule (I):

5 Xaa-Lys-Ile-Pro-Xab-Ala-Xac-Lys-Gly-Ala-Xad-Arg-Ala-Leu-Xae-Ala-Ser-Thr-Ala-Xaf-Asp-Ile-Ala-Xag-Phe-Xah-Arg-Lys-Arg-Xai (I) (SEQ ID NO :1 dans la liste de séquences en annexe)

dans laquelle,

10 Xaa est -NH<sub>2</sub> ou le reste peptidique Arg ou Gly,  
Xab est le reste peptidique Ile-Asn ou Val-Glu,  
Xac est le reste peptidique Ile-Lys, Ile-Arg ou Leu-Lys,

Xad est le reste peptidique Ser-Arg-Ala-Trp,  
15 Lys-Ala-Val-Gly-His-Gly-Leu ou Lys-Val-Ala-Gly-Arg-Ala-Trp,  
Xae est le reste peptidique Asp-Leu, Asn-Ile ou Asp-Leu,

Xaf est le reste peptidique Tyr ou His,  
Xag est le reste peptidique Ser-Ile, Ser-Ala ou  
20 His-Leu,

Xah est le reste peptidique Asn, Asp ou His,  
Xai est -OH ou le reste peptidique Glu, Asn ou Lys-His,  
ses dérivés et ses fragments.

25

2) Peptide isolé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il répond à l'une des séquences suivantes :

- ETD-P1646 G K I P I N A I R K G A K A V G H  
30 G L R A L N I A S T A H D I A S A F H R K R K H (SEQ ID NO :2 dans la liste de séquences en annexe)

- ETD-P1647 R K I P V E A I K K G A S R A W R  
A L D L A S T A Y D I A S I F N R K R E (SEQ ID NO :3 dans la liste de séquences en annexe)

- ETD-P1648 G K I P V E A L K K G A K V A G R  
 A W R A L D L A S T A Y D I A H L F D R K R N (SEQ ID NO :4  
 dans la liste de séquences en annexe),  
 ses dérivés et ses fragments.

5

3) Polypeptide caractérisé en ce qu'il comprend  
 un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 ou  
 2.

10

4) Polypeptide selon la revendication 3,  
 caractérisé en ce qu'il comprend un peptide selon l'une  
 quelconque des revendications 1 ou 2 dont l'une et/ou  
 l'autre des extrémités dudit peptide comprend un ou  
 plusieurs acides aminés nécessaires à son expression et/ou  
 à son ciblage dans un organisme hôte.

15

5) Polynucléotide isolé caractérisé en ce qu'il  
 code un peptide selon l'une quelconque des revendications 1  
 ou 2 ou un polypeptide selon l'une quelconque des  
 revendications 3 ou 4.

20

6) Polynucléotide isolé caractérisé en ce qu'il  
 s'hybride à un polynucléotide selon la revendication 5.

25

7) Gène chimère caractérisé en ce qu'il  
 comprend au moins, liés entre eux de façon opérationnelle :

- un promoteur constitutif ou inductible  
 fonctionnel dans un organisme hôte,

30

- un polynucléotide selon l'une quelconque des  
 revendications 5 ou 6, et

- un élément terminateur fonctionnel dans un  
 organisme hôte.

8) Gène chimère selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il comprend en outre un peptide signal ou de transit fonctionnel dans ledit organisme hôte.

5           9) Vecteur d'expression et/ou de clonage caractérisé en ce qu'il comprend un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 5 ou 6 ou un gène chimère selon l'une quelconque des revendications 7 ou 8.

10           10) Vecteur d'expression et/ou de clonage selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'il est un plasmide, un cosmide ou un bactériophage.

15           11) Vecteur d'expression et/ou de clonage selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'il est un virus en particulier un baculovirus.

20           12) Organisme hôte caractérisé en ce qu'il comprend un vecteur selon l'une des revendications de 9 à 11.

          13) Organisme hôte selon la revendication 12, caractérisé en ce qu'il est un microorganisme.

25           14) Organisme hôte selon la revendication 13, caractérisé en ce que le microorganisme est une levure du genre *Saccharomyces*, de préférence de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*, du genre *Kluyveromyces*, de préférence de l'espèce *Kluyveromyces lactis*, du genre  
30 *Hansenula*, de préférence de l'espèce *Hansenula polymorpha*, du genre *Pichia*, de préférence de l'espèce *Pichia pastoris* ou du genre *Schizosaccharomyces*, de préférence de l'espèce *Schizosaccharomyces pombe*.

- 15) Organisme hôte selon la revendication 13, caractérisé en ce que le microorganisme est une bactérie, de préférence de l'espèce *Escherichia coli*.
- 5            16) Organisme hôte selon la revendication 13, caractérisé en ce que le microorganisme est un champignon de préférence de l'espèce *Aspergillus nidulans*.
- 10           17) Organisme hôte selon la revendication 12, caractérisé en ce que l'organisme hôte est une cellule d'arthropode de préférence de *Spodoptera frugiperda* ou de *Trichoplusia ni*.
- 15           18) Organisme hôte selon la revendication 12, caractérisé en ce que l'organisme hôte est une cellule de mammifère.
- 20           19) Organisme hôte selon la revendication 12, caractérisé en ce que l'organisme hôte est une cellule végétale ou une plante.
- 25           20) Cellule végétale ou plante résistante aux maladies bactériennes et/ou fongiques comprenant un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 5 ou 6, ou un gène chimère selon l'une quelconque des revendications 7 ou 8, et exprime un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, ou un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 3 ou 4.
- 30           21) Composition antibactérienne caractérisée en ce qu'elle comprend à titre d'agent actif au moins un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, avantageusement associé dans ladite composition avec un véhicule acceptable.

22) Composition antibactérienne selon la revendication 21, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre un autre agent antibactérien.

5

23) Composition antifongique caractérisée en ce qu'elle comprend à titre d'agent actif au moins un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, avantageusement associé dans ladite composition avec un véhicule acceptable.

10

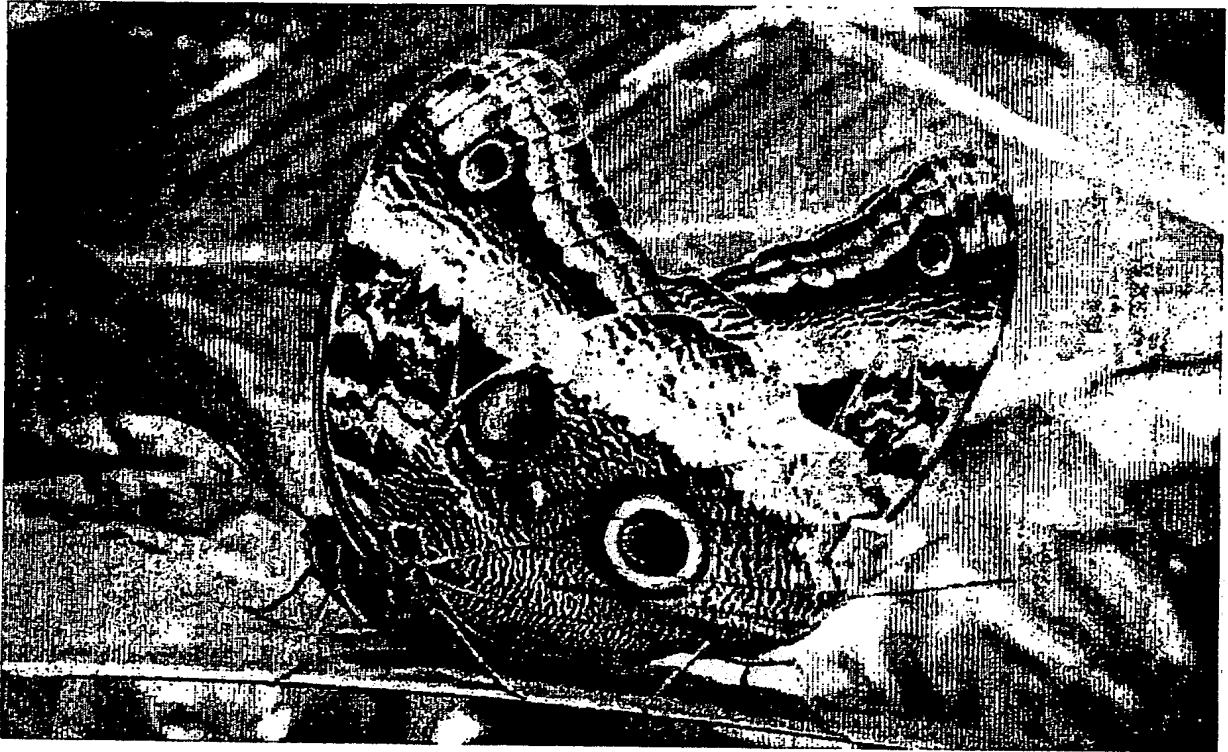
24) Composition antifongique selon la revendication 23, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre un autre agent antifongique.

15

25) Composition selon l'une quelconque des revendications 21 à 24 pour être utilisée chez l'homme ou l'animal.

20

26) Composition selon l'une quelconque des revendications 21 à 24 pour être utilisée chez les plantes.



*Caligo illioneus* (Cramer, 1776)  
(famille des *Nympholidae*; sous-famille des *Brassolinae*)

Figure 1

## SEQUENCE LISTING

<110> ENTOMED SA

<120> Peptides antimicrobiens, polypeptides comprenant lesdits peptides, gènes codant lesdits peptides, vecteurs, organismes transformés et compositions les contenant

<130> 28079/PCT

<140> PCT/FR03/XXXXX

<141> 2003-08-13

<150> FR02/10278

<151> 2002-08-13

<160> 4

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 30

<212> PRT

<213> Caligo illioneus

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa est -NH2 ou le reste peptidique Arg ou Gly

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xab est le reste peptidique Ile-Asn ou Val-Glu

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Xac est le reste peptidique Ile-Lys, Ile-Arg ou Leu-Lys

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (11)..(11)

<223> Xad est le reste peptidique Ser-Arg-Ala-Trp, Lys-Ala-Val-Gly-His-Gly-Leu, Lys-Val-Ala-Gly-Arg-Ala-Trp

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (15)..(15)

<223> Xae est le reste peptidique Asp-Leu, Asn-Ile ou Asp-Leu

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (20)..(20)

<223> Xaf est le reste peptidique Tyr ou Lys

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (24)..(24)

<223> Xag est le reste peptidique Ser-Ile, Ser-Ala ou His-Leu

<220>

<221> MISC\_FEATURE  
 <222> (26)..(26)  
 <223> Xah est le reste peptidique Asn, Asp ou His

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (30)..(30)  
 <223> Xai est -OH ou le reste peptidique Glu, Asn ou Lys-His

<220>  
 <221> PEPTIDE  
 <222> (1)..(30)  
 <223> Formule (I) à laquelle répond les peptides antibactériens isolés à partir de l'hémolymphe de larves immunisées du lépidoptère Caligo illioneus

<400> 1

Xaa Lys Ile Pro Xaa Ala Xaa Lys Gly Ala Xaa Arg Ala Leu Xaa Ala  
 1 5 10 15

Ser Thr Ala Xaa Asp Ile Ala Xaa Phe Xaa Arg Lys Arg Xaa  
 20 25 30

<210> 2  
 <211> 41  
 <212> PRT  
 <213> Caligo illioneus

<220>  
 <221> PEPTIDE  
 <222> (1)..(41)  
 <223> Peptide ETD-P1646

<400> 2

Gly Lys Ile Pro Ile Asn Ala Ile Arg Lys Gly Ala Lys Ala Val Gly  
 1 5 10 15

His Gly Leu Arg Ala Leu Asn Ile Ala Ser Thr Ala His Asp Ile Ala  
 20 25 30

Ser Ala Phe His Arg Lys Arg Lys His  
 35 40

<210> 3  
 <211> 37  
 <212> PRT  
 <213> Caligo illioneus

<220>  
 <221> PEPTIDE  
 <222> (1)..(37)  
 <223> Peptide ETD-P1647

<400> 3

Arg Lys Ile Pro Val Glu Ala Ile Lys Lys Gly Ala Ser Arg Ala Trp  
 1 5 10 15

Arg Ala Leu Asp Leu Ala Ser Thr Ala Tyr Asp Ile Ala Ser Ile Phe  
                   20                  25                  30

Asn Arg Lys Arg Glu  
           35

<210> 4  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Caligo illioneus

<220>  
 <221> PEPTIDE  
 <222> (1)..(40)  
 <223> Peptide ETD-P1648

<400> 4

Gly Lys Ile Pro Val Glu Ala Leu Lys Lys Gly Ala Lys Val Ala Gly  
 1                  5                  10                  15

Arg Ala Trp Arg Ala Leu Asp Leu Ala Ser Thr Ala Tyr Asp Ile Ala  
           20                  25                  30

His Leu Phe Asp Arg Lys Arg Asn  
           35                  40

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 03/02517

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K14/435 C12N15/12 C12N15/63 A61K38/17 A61P31/00  
A01H5/00 A01N37/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K A61K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

SEQUENCE SEARCH, CHEM ABS Data, BIOSIS, PAJ, EPO-Internal, WPI Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HARA S & YAMAKAWA M: "Moricin, a Novel Type of Antibacterial Peptide Isolated from the Silkworm, Bombyx mori" THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 270, no. 50, 15 December 1995 (1995-12-15), pages 29923-29927, XP002079760 abstract; figure 3	
A	FR 2 723 951 A (AGRICULTURE FORESTRY AND FISHERIES TECHNICAL INFORMATION SOCIETY - JP) 1 March 1996 (1996-03-01) claims 1-15	

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

\*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

\*E\* earlier document but published on or after the international filing date

\*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

\*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

\*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*G\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 January 2004

Date of mailing of the international search report

28/01/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Schmidt, Harald

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 03/02517

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: 1-26 (in part)  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

**see supplementary sheet FOLLOWING INFORMATION PCT/ISA/210**

3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 03/02517

The current claims 1 to 26 relate to a very large number of peptides, yet only a limited number of the claimed peptides is supported by the description (PCT Article 6) and/or disclosed in the application (PCT Article 5). In the present case the claims lack support and the disclosure of the invention in the description is inadequate to such an extent that it does not appear possible to carry out a meaningful search covering the entire claimed scope of protection. The search was therefore restricted to the parts of the claims that are supported and disclosed, namely the parts that relate to the peptides of formula (I) and to the sequences ETD-P1646, ETD-P1647 and ETD-P1648, without their derivatives and fragments.

The applicant is advised that claims or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established cannot normally be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subjects that have not been searched. This also applies to cases where the claims were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or where the applicant submits new claims in the course of the procedure under PCT Chapter II.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 03/02517

Information on patent family members

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2723951	A	01-03-1996	JP 3459314 B2	20-10-2003
			JP 8119995 A	14-05-1996
			DE 19532001 A1	07-03-1996
			FR 2723951 A1	01-03-1996
			US 5646014 A	08-07-1997

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 03/02517

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C07K14/435 C12N15/12 C12N15/63 A61K38/17 A61P31/00  
A01H5/00 A01N37/18

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C07K A61K C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

SEQUENCE SEARCH, CHEM ABS Data, BIOSIS, PAJ, EPO-Internal, WPI Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
-------------	--	-------------------------------

A	HARA S & YAMAKAWA M: "Moricin, a Novel Type of Antibacterial Peptide Isolated from the Silkworm, Bombyx mori" THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 270, no. 50, 15 décembre 1995 (1995-12-15), pages 29923-29927, XP002079760 abrégé; figure 3	
---	---	--

A	FR 2 723 951 A (AGRICULTURE FORESTRY AND FISHERIES TECHNICAL INFORMATION SOCIETY - JP) 1 mars 1996 (1996-03-01) revendications 1-15	
---	---	--

☐ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### \* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- \*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- \*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- \*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- \*Z\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

13 janvier 2004

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

28/01/2004

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3018

Fonctionnaire autorisé

Schmidt, Harald

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°  
PCT/FR 03/02517

## Cadre I Observations – lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☐ Les revendications n°  
se rapportant à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
2. ☒ Les revendications n° 1-26 (partiellement)  
se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:  
voir feuille supplémentaire SUITE DES RENSEIGNEMENTS PCT/ISA/210
3. ☐ Les revendications n°  
sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

## Cadre II Observations – lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prétaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

## SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUES SUR PCT/ISA/ 210

Suite du cadre I.2

Revendications nos.: 1-26 (partiellement)

Les revendications 1 à 26 présentes ont trait à une très grande variété de peptides. Un fondement au sens de L'Article 6 PCT et/ou un exposé au sens de l'Article 5 PCT ne peut cependant être trouvé que pour un nombre très restreint de ces peptides revendiqués. Dans le cas présent, les revendications manquent à un tel point de fondement et l'exposé de l'invention dans la description est si limité qu'une recherche significative couvrant tout le spectre revendiqué est impossible. Par conséquent, la recherche a été limitée aux parties des revendications qui présentent un fondement et un exposé, c'est à dire les parties ayant trait aux peptides répondant à la formule (I) et aux séquences ETD-P1646, ETD-P1647 et ETD-P1648 sans leurs dérivés et leurs fragments.

L'attention du déposant est attirée sur le fait que les revendications, ou des parties de revendications, ayant trait aux inventions pour lesquelles aucun rapport de recherche n'a été établi ne peuvent faire obligatoirement l'objet d'un rapport préliminaire d'examen (Règle 66.1(e) PCT). Le déposant est averti que la ligne de conduite adoptée par l'OEB agissant en qualité d'administration chargée de l'examen préliminaire international est, normalement, de ne pas procéder à un examen préliminaire sur un sujet n'ayant pas fait l'objet d'une recherche. Cette attitude restera inchangée, indépendamment du fait que les revendications aient ou n'aient pas été modifiées, soit après la réception du rapport de recherche, soit pendant une quelconque procédure sous le Chapitre II.

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 03/02517

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR 2723951 A	01-03-1996	JP 3459314 B2	20-10-2003
		JP 8119995 A	14-05-1996
		DE 19532001 A1	07-03-1996
		FR 2723951 A1	01-03-1996
		US 5646014 A	08-07-1997